

УДК 633.63:581. 143.6:576.356.5

ДОБІР ТЕТРАПЛОЇДНИХ ФОРМ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ У КУЛЬТУРИ *IN VITRO* З ВИКОРИСТАННЯМ НЕПРЯМИХ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ПЛОЇДНОСТІ

БЕХ Н.С. -

зав. сектором культури клітин і тканин *in vitro*,

РОЇК М. В. -

доктор с.-г. наук, академік НААН України,

ВОЙТОВСЬКА В.І. -

науковий співробітник,

НЕДЯК Т.М. -

науковий співробітник,

(Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН).

Вступ. Сучасна селекція цукрових буряків спрямована на створення гетерозисних гібридів на основі цитоплазматичної чоловічої стерильності. Отримання кращих гібридних комбінацій – результат довготривалих селекційних випробувань материнського і батьківського компонентів та їх підбір для гібридизації. Одним із важливих завдань є створення стабільних багатонасінних тетраплоїдних запилювачів з високою пилкоутворюючою здатністю і доброю якістю пилку, що слугують запилювачами для одностійних пилкостерильних форм.

Традиційно отримують поліплоїди багаторазовою обробкою 0,2-1,0 % розчином колхіцину точок росту проростків, бруньок рослин першого і другого років вегетації, насіння та добром рослин, які змінили рівень плоїдності [1-4]. Найбільш точною оцінкою плоїдності є підрахунок кількості хромосом у меристематичних клітинах.

Оскільки цукрові буряки дворічна перехреснозапиљна культура, на отримання тетраплоїдних запилювачів необхідно 6-8 років. Тому актуальною є розробка нових методів створення і добору тетраплоїдних форм, які б прискорили даний процес. У зв'язку з цим був розроблений метод поліплоїдизації у культурі *in vitro*, який дозволяє отримати стабільні тетраплоїдні форми протягом одного року [5-8]. Для виділення тетраплоїдних форм серед поліплоїдизованого матеріалу необхідно провести значну кількість аналізів з визначення кількості хромосом. Цей аналіз трудомісткий і займає багато часу, крім того для його проведення необхідно брати точку росту бруньки.

Тому був проведений пошук маркерних ознак тетраплоїдних рослин у культурі *in vitro*, які можна було б використо-

вувати для попереднього добору тетраплоїдів серед колхіцинованого матеріалу.

Матеріали і методи. В якості вихідного матеріалу були використані диплоїдні селекційні номери 1351 АС-стійкий до ризоманії та АС-56- стійкий до церкоспорозу. Клональне мікророзмноження проводили за розробленою в ІЦБ методикою [9]. Визначення плоїдності у меристематичних клітинах бруньок із культури *in vitro* проводили за модифікованим методом визначення числа хромосом у соматичних клітинах точок росту буряків першого і другого років життя [10]. Кількість хлоропластів у замикаючих клітинах проростків - за методикою З.П. Паушевої [11]. Отриманий цифровий матеріал оброблено згідно з загальноприйнятими методами [12].

Результати досліджень та їх обговорення. При вирощуванні тетраплоїдних (4x) і диплоїдних форм (2x) цукрових буряків *in vitro* та *in vivo* вивчали морфологічні особливості листків.

Як видно із таблиці 1, листки тетраплоїдних форм у культурі *in vitro* більші за

розмірами і мають меншу кількість жилок (від 9 до 10 шт.), ніж їх вихідна диплоїдна форма, у якої менша площа листової пластинки, а середня кількість жилок дорівнювала 14,2.

Менша кількість жилок у тетраплоїдів (11,8шт.) порівняно з диплоїдами (16,4 шт.) зберігалась і при вирощуванні рослин у полі (мал.1).

Вони мали товстіше й ширше темно-зелене листя із серцевидною формою прикріплення листової пластинки до черешка і укорочені товсті черешки, нахилені до поверхні землі, що робить розетку листків більш розпластаною і призводить до раннього змикання рядків.

У зв'язку з тим, що після колхіцинування необхідно аналізувати велику кількість матеріалів, був проведений пошук морфологічних ознак рослин у культурі *in vitro*, які дозволили б проводити попередню оцінку рівня плоїдності.

Цитологічні дослідження нижнього зрізу листка культуральних рослин цукрових буряків дозволяють визначити кількість проростків в полі зору та кількість

Таблиця 1.
Морфологічні особливості листків тетраплоїдних і вихідних диплоїдних форм цукрових буряків *in vitro* та *in vivo*

Селекційний номер	Показники <i>in vitro</i>						Показники <i>in vivo</i>	
	плоїдність	довжина листка, см	ширина листка, см	довжина: ширина	площа листка, см ²	кількість жилок, шт	плоїдність	кількість жилок, шт
1351 АС -1	4x	1,6	1,1	1,4	1,3	9,8	4x	12,7
1351 АС- 2	4x	1,1	0,9	1,2	0,7	9,4	4x	-
1351 АС -3	4x	1,6	1,1	1,4	1,3	10,1	4x	11,9
1351 АС -5	4x	1,5	0,9	1,7	1,0	9,0	4x	10,8
середнє	4x	1,5	1,0	1,4	1,1	9,6	4x	11,8
1351 АС	2x	1,3	0,8	1,6	0,8	14,2	2x	16,4



Мал. 1. Тетраплоїдні рослини у полі і у культурі *in vitro* та жилкування на їх листках.

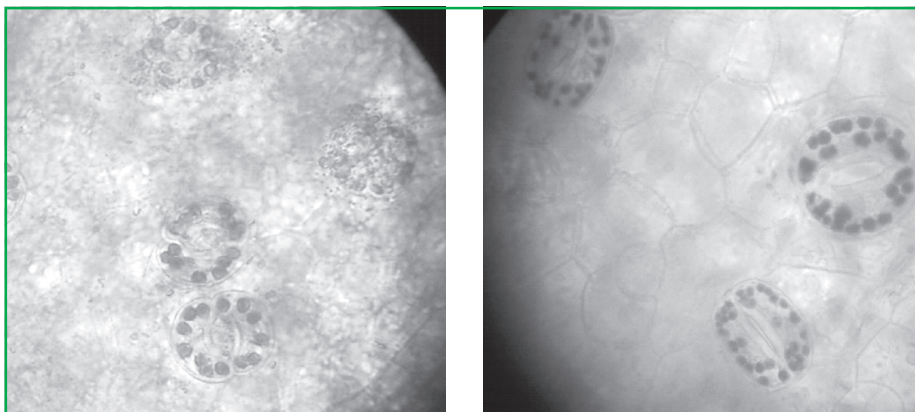
хлоропластів в замикаючих клітинах продихів, при цьому не пошкоджуючи точку росту.

Дані таблиці 2 вказують на те, що тетраплоїдні рослини порівняно з вихідною диплоїдною формою мають достовірно меншу кількість продихів у полі

зору (9,7 шт. проти 18,1 шт.), більшу кількість хлоропластів у замикаючих клітинах продиху (27,6 шт. проти 16,0 шт.) і меншу кількість жилок на листку (9,0 шт. проти 11,8 шт.) (табл.2). Міксоплоїди за цими показниками займають проміжне положення.

Таблиця 2.
Характерні ознаки листків диплоїдних і тетраплоїдних рослин цукрових буряків у культурі in vitro

Селекційний номер	Показники	Плоїдність		
		2x	міксо-плоїди	4x
ARC 56-1	кількість продихів у полі зору, шт.	17,3	13,2	10,6
	НіР ₀₅	контроль	5,6	4,4
	кількість хлоропластів у замикаючих клітинах продиху, шт.	15,7	25,4	28,6
	НіР ₀₅	контроль	6,7	6,8
	кількість жилок на листку, шт.	11,2	9,0	8,5
ARC 56-3	кількість продихів у полі зору, шт.	19,4	16,3	8,2
	НіР ₀₅	контроль	2,6	7,4
	кількість хлоропластів у замикаючих клітинах продиху, шт.	15,2	24,2	27,3
	НіР ₀₅	контроль	5,7	6,8
	кількість жилок на листку, шт.	11,8	8,6	9,4
ARC 56-4	кількість продихів у полі зору, шт.	17,6	16,0	10,2
	НіР ₀₅	контроль	4,8	6,3
	кількість хлоропластів у замикаючих клітинах продиху, шт.	17,2	16,1	27,1
	НіР ₀₅	контроль	2,1	4,8
	кількість жилок на листку, шт.	12,4	9,4	9,2
середнє	кількість продихів у полі зору, шт.	18,1	15,2	9,7
	НіР ₀₅	контроль	5,3	2,1
	кількість хлоропластів у замикаючих клітинах продиху, шт.	16,0	21,9	27,6
	НіР ₀₅	контроль	1,8	4,3
	кількість жилок на листку, шт.	11,8	9,0	9,0
	НіР ₀₅	контроль	1,1	1,3



Мал. 2. Хлоропласти у замикаючих клітинах продихів вихідної диплоїдної форми і тетраплоїди цукрових буряків.

Таким чином, дані про кількість продихів у полі зору, кількість хлоропластів у замикаючих клітинах продиху та кількість жилок на листку можуть бути використані як маркерні ознаки для попереднього добору тетраплоїдних форм серед поліплоїдизованого матеріалу з подальшою оцінкою кількості хромосом у меристематичних клітинах бруньок.

Бібліографія

1. Цветова М.И., Ишин А.Г. Эффективность различных способов колхичинирования (на примере злаков) // С.-х. биол. Сер. Биол. раст.- 1999.-№5.-С 110-121.
2. Lu Chunsheng, Bridgen Mark P. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea* // *Euphytica*. -1997.- 94, №1.
3. Park C.H., Kim D.W. Colchicine – induced variation in *Kochia Scoparia* Schrad // 15-th Int. Bot. Congr. – Yokogama. -1993. – P. 522
4. Frcek Jan. Metoodicka polyplodizace dihaploidu brambor *Kolchicinem*// *Vyrk. Ust. Brambor. Haulic Kuv Brod.* – 1999.- 13.-P. 27 – 47.
5. Роїк М.В., Редько В.І., Кірсанова Ю.В., Недяк Т.М., Ніколаєнко А.П. Спосіб отримання тетраплоїдів у культурі in vitro МПК 7A01/ H4/00. Патент №45656. заявл.25.5.2001; опубл.15.4.2002, Бюл. Промислова власність №4.
6. Роїк М.В., Бех Н.С., Редько В.І. Створення тетраплоїдів цукрових буряків у культурі in vitro// Фактори експериментальної еволюції організмів. - К.: Логос.- 2006.- С 503-506.
7. Редько В.І., Роїк М.В., Бех Н.С., Недяк Т.М., Слущька Н.П. Прискорення селекції цукрових буряків біотехнологічними методами// *Зб. наук. пр. ІЦБ.-2010.-Вип.11.- С. 107-112.*
8. Роїк М.В., Редько В.І., Бех Н.С., Недяк Т.М., Білоус Н.В., Войтов Ю.В. Отримання тетраплоїдів кормових буряків шляхом поліплоїдизації у культурі in vitro//*Цукрові буряки.- 2010.- №2.- С.6-7.*
9. Редько В.І., Ільєнко І.І., Павловська Л.Л., Білоус В.О. Методичні рекомендації по клональному мікророзмноженню цукрових буряків.- К., 1997.- 10с.
10. Ярмолюк Г.И., Ширяева Э. И. Цитологические и цитогенетические исследования в селекции сахарной свеклы. –К.: Наукова думка, 1982.- 54с.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений.- М.: Агропромиздат, 1988.- 271с.
12. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта.- М.: Агропромиздат, 1985.- 351с.

Анотація

Тетраплоїди цукрових буряків у культурі in vitro мають більші листки з меншою кількістю жилок, менше продихів, але більшої величини і з більшою кількістю хлоропластів, ніж вихідні диплоїдні форми. За цими ознаками можливо проводити попередній добір тетраплоїдних форм серед значних обсягів поліплоїдизованих у культурі in vitro матеріалів цукрових буряків.

Анотация

Тетраплоиды сахарной свеклы в культуре in vitro имеют более крупные листья с меньшим количеством жилок, меньше устьиц, но большей величины и с большим количеством хлоропластов чем исходная диплоидная форма. За этими показателями возможно проводить предварительный отбор тетраплоидных форм среди большого объема полиплоидизированных в культуре in vitro материалов сахарной свеклы.

Annotation

Sugar beet tetraploids in vitro culture have larger leaves with smaller quantity of veins, less pores, but greater size and with greater quantity of chloroplasts, than the original diploid form. On the basis of these characters it is possible to carry out the first selection of tetraploid forms among the considerable volumes of poliploidyzed materials of sugar beets in vitro culture